

07303482 A(19) (11) Publication number: 07303482 A

Generated Document.

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(21) Application number: 07109884

(51) Intl. Cl.: C12N 9/64 C07K 16/30 C07K 16/32 C07K 16/40 C12N 1/21  
C12N 15/09 C12P 21/08 G01N 33/53 G01N 33/573 G01N 33/574 G01N 33/577

(22) Application date: 31.03.95

(30) Priority: 30.11.93 JP 05341061

(43) Date of application publication: 21.11.95

(84) Designated contracting states:

(71) Applicant: FUJI YAKUHIN KOGYO KK

(72) Inventor: SEIKI MOTOHARU  
SATO HIROSHI  
SHINAGAWA AKIRA

(74) Representative:

(54) NEW METALLOPROTEASE AND DNA CODING THE SAME

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a protein having a specific amino acid sequence, and useful for physiological degradation and medical applications such as diagnosing cancerous cell presence/absence and cancer malignancy.

CONSTITUTION: This protein has an amino acid sequence of the formula, and is obtained by culturing a host cell having a plasmid containing a DNA coding this protein and capable of manifesting this protein. It is preferable that a monoclonal antibody be obtained by using this protein (the objective new matrix metalloprotease) as immunogen.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-303482

(43)公開日 平成7年(1995)11月21日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 9/64	Z			
C 07 K 16/30		8318-4H		
16/32		8318-4H		
16/40		8318-4H		
	9281-4B	C 12 N 15/00	Z N A A	
		審査請求 未請求 請求項の数 5 書面 (全 28 頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号 特願平7-109884

(62)分割の表示 特願平6-331305の分割

(22)出願日 平成6年(1994)11月30日

(31)優先権主張番号 特願平5-341061

(32)優先日 平5(1993)11月30日

(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 390010205

富士薬品工業株式会社

富山県高岡市長慶寺530番地

(72)発明者 清木 元治

石川県金沢市涌波3丁目10番14号

(72)発明者 佐藤 博

石川県金沢市平和町3丁目18番15号 平和  
宿舎C57-11

(72)発明者 品川 朗

富山県高岡市長慶寺530番地 富士薬品工  
業株式会社内

(74)代理人 弁理士 川上 宣男

(54)【発明の名称】 新規なメタロプロテアーゼおよびそれをコードするDNA

(57)【要約】

【構成】 新規なメタロプロテアーゼ、それをコードす  
るDNA、そのDNA配列を有するプラスミドおよびそ  
のプラスミドを有する宿主細胞ならびにそのタンパク質  
に特異的に結合するモノクローナル抗体。

【効果】 癌細胞の存在の有無、癌の悪性度の診断等の  
医学的、生理学的分野の用途に有用である。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表配列番号1に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質。

【請求項2】 配列表配列番号1に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする配列表配列番号2に示されている塩基配列を有するDNA。

【請求項3】 配列表配列番号2に示されている塩基配列を有するDNA配列を含有し、配列表配列番号1に示されているタンパク質を発現するプラスミド。

【請求項4】 配列表配列番号2に示されている塩基配列を有するDNA配列を含有し、配列表配列番号1に示されているタンパク質を発現するプラスミドを有する宿主細胞。  
10

【請求項5】 配列表配列番号1に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【技術分野】 本発明は、癌細胞の存在の有無、癌の悪性度の診断等に、あるいはその他の医学的、生理学的分野の用途に有用な新規なメタロプロテアーゼに関する。

【0002】 さらに詳しく言えは、本発明はヒト癌細胞で特異的に発現しているメタロプロテアーゼの1種ならびにそれをコードする遺伝子DNA配列、そのDNA配列を含有する塩基配列を有するプラスミド、そのプラスミドを有する宿主細胞、該宿主細胞を用いる該タンパク質の製造方法、前記DNA配列とハイブリダイズするプローブ、該プローブを用いる前記DNA配列を有するDNAまたはRNAの検出方法、前記のタンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体に関するものである。  
20

## 【0003】

【背景技術】 コラーゲン、プロテオグリカン、エラスタン、フィプロネクチン、ラミニン等の複雑な成分から構成される細胞外マトリックスの分解には、基質特異性を異にするマトリックスメタロプロテアーゼと総称される一群の酵素（以下MMPsと略記する）が関与している。

【0004】 これまでMMPsとしては、間質型コラゲナーゼ（MMP-1）、72kDaゼラチナーゼ（IV型コラゲナーゼあるいはゼラチナーゼAともいう：MMP-2）、92kDaゼラチナーゼ（IV型コラゲナーゼあるいはゼラチナーゼBともいう：MMP-9）、ストロムライシン-1（MMP-3）、マトリライシン（MMP-7）、好中球コラゲナーゼ（MMP-8）、ストロムライシン-2（MMP-10）、ストロムライシン-3（MMP-11）等が報告されている。  
40

【0005】 これらのMMPsはファミリーを形成し、遺伝子の一次構造は既に報告されている。決定されているMMPsファミリー間の一次構造においては、MMP-7を除き各MMPは基本的にN-末端プロペプチドド

2

メイン、Zn<sup>+</sup>結合触媒ドメイン、C-末端ヘモベキシン凝血酵素様ドメインの3つから構成されている。MMP-7においてはヘモベキシン凝血酵素様ドメインはない。MMP-2とMMP-9では、この他にゼラチン結合ドメインを含んでいる。さらに、MMP-9では、Zn<sup>+</sup>結合触媒ドメインとC-末端ヘモベキシン凝血酵素様ドメインの間にプロリンに富むV型コラーゲンα2鎖と相同性の高いドメインが挿入されている。

【0006】 転移性の高い癌細胞では、IV型コラーゲンを主たる基質とするIV型コラゲナーゼ（MMP-2、MMP-9）の顕著な発現が見られることが報告されており（キャンサー リサーチ（Cancer Res.）、第46巻、1～7頁（1986）；バイオケミカル アンド バイオフィジカル リサーチ コミュニケーションズ（Biochem. Biophys. Res. Commun.）、第154巻、832～838頁（1988）；キャンサー（Cancer）、第71巻、1368～1383頁（1993））、また、MMP-9の活性化がMMP-3の作用によって引き起こされることが報告されている（ザ ジャーナルオブ バイオロジカル ケミストリー（J. Biol. Chem.）第267巻、3581～3584頁（1992））。マトリックスメタロプロテアーゼの発現の程度は、癌の悪性度を診断する指標となる。

## 【0007】

【発明の開示】 本発明者らは新規なマトリックスメタロプロテアーゼ（以下本明細書においてはMT-MMPと記述する）を見出し、その構造分析を行った。本発明により、下記に記載されるとおり、新規なメタロプロテアーゼタンパク質、そのタンパク質をコードする塩基配列を有するDNA、このDNA塩基配列を有するプラスミド、このプラスミドを有する宿主細胞ならびに上記メタロプロテアーゼタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体が提供される。

1. 配列表配列番号1に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質。
2. 配列表配列番号1に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする配列表配列番号2に示されている塩基配列を有するDNA。
3. 配列表配列番号2に示されている塩基配列を有するDNA配列を含有し、配列表配列番号1に示されているタンパク質を発現するプラスミド。
4. 配列表配列番号2に示されている塩基配列を有するDNA配列を含有し、配列表配列番号1に示されているタンパク質を発現するプラスミドを有する宿主細胞。
5. 配列表配列番号1に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体。

【0009】 以下に、本発明を詳細に説明する。本発明者らは、公知のマトリックスメタロプロテアーゼ（MM

P) ファミリーのアミノ酸配列から選択した高度に保存されている配列(配列表配列番号3および4)より、配列表配列番号5および6に記載した配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを設計、合成した。該オリゴヌクレオチドプライマーとヒト胎盤cDNAライブラリーを用い、PCR反応を行い、得られたPCR産物の各DNAの塩基配列を決定し、公知のMMPと相同でない配列を有する390b.p.のDNA断片を得た。この390b.p. DNA断片をプローブとし、ヒト胎盤cDNAライブラリーのスクリーニングを行い、得られた陽性クローニングのファージDNA中に組み込まれていたcDNAの塩基配列を決定した。塩基配列は配列表配列番号2に記載の塩基配列である。配列表配列番号2に記載の塩基配列と同一の配列は、GENBANK/EMBL DNA Data Base中には存在せず、この塩基配列を有するDNAは全く新規なものであることが認められた。

【0010】配列表配列番号2に記載した上記のクローニングのcDNAの塩基配列は、3'非翻訳配列と共に推定582アミノ酸残基のオープンリーディングフレームを有していた。開始コドンは塩基番号112に位置し、停止コドンは塩基番号1858に存在する。このオープンリーディングフレームは、配列表配列番号1に記載した582アミノ酸からなる配列をコードしており、開始コドンのすぐ下流から推定されるシグナル配列が続き、C末端のアミノ酸番号533から562に20個以上の疎水性アミノ酸の連続した膜結合型タンパク質に特徴的な疎水性領域(配列表配列番号7)が存在することが認められた。

【0011】図2に示すようにMT-MMPのアミノ酸配列と公知のMMPファミリーのアミノ酸配列との相同性を調査した結果、MT-MMPは公知のMMPファミリーと高い相同性を示した。MMPファミリーで保存されている前駆体と成熟体のプロセッシング部位近傍の配列、および活性部位の配列はMT-MMP中で最も良好に保存されていた。またMT-MMPでは、他のMMPファミリーのアミノ酸配列上には認められない配列表配列番号7に示した疎水性アミノ酸の連続した配列が存在し、膜貫通型タンパク質の構造的特徴を有することから、他のMMPファミリーとは異なる膜結合型のMMPであることが強く示唆された。

【0012】MT-MMPのヒト組織中の発現を各種の組織由来P<sub>0</sub>1y(A)RNAに対するノーザンプロット分析により検討した結果、胎盤、肺、腎臓で高い発現をしていることが認められた(図3参照)。また、ヒト肺偏平上皮癌の正常部分および癌部分から抽出したRNAに対しノーザンプロット分析を行った結果、MT-MMPは癌部位で特異的に発現していることが認められた(図4参照)。なお、本発明のMT-MMPは、抗MT-MMPモノクローナル抗体を用いた免疫沈降や免疫

染色実験により遺伝子産物が分泌されることなく細胞膜上に発現されていることが示され、また、MT-MMP遺伝子をトランスフェクションした細胞では、MT-MMPの発現に依存したMMP-2の活性化が観察された(ネイチャー(Nature)、第370巻、61~65頁(1994))。以上述べた本発明者らの研究成果により、本発明により、配列表配列番号1に記載されたアミノ酸配列を有する新規なマトリックスメタロプロテーゼタンパク質が提供される。

【0013】また、本発明により配列表配列番号1に記載されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしている配列表配列番号2に記載された塩基配列を有するDNA、該DNAを有し発現し得るプラスミド、このプラスミドを有する宿主細胞が提供される。上記の宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌などの原核細胞宿主、酵母、COS細胞、CHO細胞、3T3細胞などの真核細胞、Sf21などの昆虫細胞等、通常遺伝子組換え技術で用いられる全ての宿主細胞を用いることができる。上記のプラスミドとしては、通常用いられる宿主細胞に応じた発現ベクターを用いることができる。

【0014】さらに本発明により、配列表配列番号2に記載された塩基配列を有するDNAから転写されるmRNAが提供される。上記のDNAあるいはRNAとハイブリダイズし、該DNAまたはRNAを特異的に検出するプローブも提供されるが、該プローブは、通常使用される放射性同位元素、酵素などにより標識され、通常のプロッティング分析、In situハイブリダイゼーションで該DNAあるいはRNAと特異的にハイブリダイズし、検出できるものであれば配列表配列番号2に記載した塩基配列の一部を有するものであればよく、どのような塩基配列でもよい。

【0015】さらに、本発明は、本発明に係るMT-MMPと特異的に結合するモノクローナル抗体を提供する。本発明に係るモノクローナル抗体は、ヒトMT-MMPを免疫原として公知の方法、例えばミルシュタインらの方法(ネイチャー(Nature)、第256巻、495~497頁(1975))により製造することができる。この方法において、免疫原としては天然型ヒトMT-MMP、組換えヒトMT-MMPおよびそれらの一部のアミノ酸配列を有する合成ペプチド等の何れでもよい。

【0016】本発明により、本発明に係る新規なMT-MMPのアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAをクローニングし、そのDNAおよびそのDNAにコードされているタンパク質を遺伝子工学的方法により製造することができる。この新規なMT-MMPのcDNAクローニングを用いることにより、上記の塩基配列を遺伝子工学的に常用される方法を用いて他のベクターあるいは宿主へのクローニングを行うことができる。また、上記のcDNAの塩基配列に準拠して適

宜、プローブに適したDNAを設計し、調製することができる。さらに、本発明に係わるMT-MMPの遺伝子塩基配列をもとに遺伝子工学的に常用される方法を用いることにより、MT-MMPのアミノ酸配列中に適宜、1個ないしは複数個以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、転移あるいは付加した如き変異を導入した相当するタンパク質を製造することができる。メタロプロテアーゼの共通の特徴である前駆体と成熟体のプロッセシング部位近傍の配列や活性部位の配列、ドメイン構造、MT-MMPの特徴であるC末端近傍に存在する疎水性アミノ酸の連続した疎水性領域が維持されていれば、上記の如き誘導体は全て本発明に包含される。

【0017】本発明の前述した種々の態様を利用するこ<sup>10</sup>とにより、癌細胞の存在の有無、癌の悪性度などの診断用の診断剤あるいは診断方法の用途に、あるいはまた、その他の医学的生理学的分野の用途に適用される種々の技術手段を提供することができる。以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は、これら実施例により限定されるものではない。

## 【0018】

## 【実施例】

## 実施例1

新規なメタロプロテアーゼ(MT-MMP) cDNAの単離

## (a) cDNAライブラリーの構築

ヒト胎盤組織から全RNAをグアニジン-塩化セシウム法(バイオケミストリー(Biochemistry)、第18巻、5294~5299頁(1979))により抽出し、ポリ(A)+RNAをオリゴ(dT)-セルロースカラムを使用して精製した。精製したポリ(A)+RNAをテンプレート、オリゴ(dT)をプライマーとしてガブラー・ホフマン(Gubler·Hoffmann)法(ジーン(Gene)、第25巻、263~269頁(1983))に従い、cDNAを合成した。T<sub>4</sub>DNAポリメラーゼによりcDNAの末端を平滑化した後、EcoR IメチラーゼによりcDNA中に存在するEcoR Iサイトをメチル化した。さらにEcoR Iリンカーコード(PG-G-A-A-T-T-C-C)とcDNAをT<sub>4</sub>DNAリガーゼを用い連結させた後、EcoR I消化することにより両末端にEcoR Iサイトを有するcDNAを構築した。このcDNAをλgt11のEcoR IサイトにT<sub>4</sub>DNAリガーゼを用い連結させた。次にこのcDNAを例えばインピトロパッケージングキット(Amersham)を使用し、インピトロパッケージングを行い、cDNAライブラリーを構築した。cDNAライブラリーとして市販の例えばヒト胎盤cDNAライブラリー(CLONTECH)を使用することもできる。

【0019】(b) 合成オリゴヌクレオチドプライマーの作製

既知のMMPSファミリーのアミノ酸配列の中から、MMPSファミリー中で高度に保存されているアミノ酸配列として配列表配列番号3(P-1)および配列番号4に記載した配列(P-2)を選択した。このオリゴペプチドP-1およびオリゴペプチドP-2のそれぞれに対応するオリゴデオキシヌクレオチドプライマーを設計した。すなわち、オリゴペプチド中に2つ以上のコドンでコードされるアミノ酸が存在する場合その混合物とし配列表配列番号5(プライマー1)および配列番号6(プライマー2)に記載した配列のごとく設計した。このプライマー1およびプライマー2をDNAシンセサイザModel 392(Applied Biosystems)を使用し、β-シアノエチルフォスフォアミダイト(β-cyanoethyl phosphoamidite)法により合成した。得られたプライマー1およびプライマー2は10mMリン酸ナトリウム緩衝液pH6.8で平衡化したニックカラム(Pharmacia)を用い精製した。

## 【0020】(c) PCRによる遺伝子増幅

ヒト胎盤由来のcDNAをテンプレート、前項(b)に記載したプライマー1およびプライマー2をプライマーとしてPCR反応(PCRテクノロジー(PCR Technology)63~67頁、ストックトンプレス(Stockton Press))を行った。その結果、390b.p.のPCR産物を得た。得られたPCR産物を適当なプラスミド、例えばpUC 119やpBluescriptにクローニングし、このPCR産物の塩基配列を、蛍光DNAシーケンサModel 373A(Applied Biosystems)、Taqダイプライマーサイクルシークエンシングキット(Applied Biosystems)を使用し決定した。塩基配列を決定した種々のPCR産物の中から既知MMPSの塩基配列と相同性のないPCR産物Aを得た。このPCR産物Aを前述の(a)項に記載したヒト胎盤組織cDNAライブラリーをスクリーニングするためのプローブとして用いた。プローブの<sup>32</sup>P標識は、ランダムプライムドDNAラベリングキット(Boehringer Mannheim)を使用して行った。

## 【0021】(d) cDNAライブラリーからの新規MMPS遺伝子のスクリーニングと塩基配列の決定

前述の(a)に記載したλgt11中に構築したヒト胎盤cDNAライブラリーを宿主菌大腸菌Y1090に感染させ、ブラークを形成させた。すなわち、Y1090株を0.02%マルトースを含むL培地で1晩培養後、集菌し、10mM MgSO<sub>4</sub>に懸濁した。この細胞懸濁液とファージ液を混合し37℃15分間インキュベートし、ファージを宿主菌に吸着させた。これに軟寒天を加え、Lプレート上に広げた(上記の操作を以後ブレーティングと称す)。プレートを42℃で1晩インキュベー

50 トし、ブラークを形成させた後、ナイロンフィルター

(例えば、ハイボンド-N (Amersham) ) あるいはニトロセルロースフィルター (例えばHATF (Millipore) ) をプレート上に置き、約30秒間放置した。膜を穏やかに剥がしアルカリ変性液 (0.1M NaOH、1.5M NaCl) に30秒間浸した後、中和液 (1.5M NaCl含有0.5M Tris-HCl緩衝液、pH8) に5分間浸した。このフィルターを2×SSPE (0.36M NaCl、20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、2mM EDTA) で洗浄した後、風乾した。

上述のブラークのフィルターへの転写を繰り返し、少なくとも2枚のフィルターを調製した。但し、2枚目以降のフィルターとプレートの接触時間は2分間程度に延長した。このフィルターを80°Cで2時間ベーキングし、DNAを固定した。1つのプレートから調製した少なくとも2枚のフィルターをそれぞれ42°C、1時間洗浄液 (1M NaCl、1mM EDTAおよび0.1% SDS含有50mM Tris-HCl緩衝液、pH8.0) で洗浄後、ハイブリダイゼーションバッグ中にフィルターを入れ、プレハイブリダイゼーション溶液 (50% formamide、5×Denhardt's溶液 (0.2%ウシ血清アルブミン、0.2% polyvinylpyrrolidone)、5×SSPE、0.1% SDS、100μg/ml熱変性サケ精子DNA) に浸し、42°Cで6~8時間プレハイブリダイゼーションを行った。次に100°C、5分間加熱変性させた (c) 項で記載した<sup>32</sup> P標識プローブをプレハイブリダイゼーション溶液に添加し、42°Cで1晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション完了後、フィルターを室温で多量の0.1% SDS含有2×SSC溶液で洗浄した。次にフィルターを0.1% SDS含有1×SSC溶液中に68°C、15分間置いた。このフィルターを風乾した後、X線フィルム (Kodak XR) と重ね-70°Cで1週間オートラジオグラフィーを行った。X線フィルムを現像し、1枚のプレートからできた2枚のフィルムを重ね、重なるシグナルをマークした。マークしたシグナルに相当するブラークをSM溶液 (100mM NaClおよび10mM MgSO<sub>4</sub>含有50mM Tris-HCl緩衝液、pH7.5) に懸濁した。このファージ懸濁液を適度に希釈してプレーティングし、上記と同様のスクリーニングを行い、組換え体ファージを得た。

【0022】(e) 組換え体 $\lambda$ gt11DNAの調製  
クローニングしたファージをそれぞれプレーティングし42°C、3時間インキュベートし、続いて37°C、1晩インキュベートした後SM溶液に数滴のクロロホルムを加え室温で30分間放置した。SM溶液と共に上層の軟寒天を掻き取り、遠心分離した。遠心後の上清に終濃度10%になるようにポリエチレンリコールを加え攪拌した後、4°Cで1時間放置した。これを遠心分離し上清を捨て、ファージ粒子を回収した。このファージ粒子をS

M溶液に懸濁し、グリセロールグラジェント超遠心分離法 (モレキュラークローニング、アラボラトリーマニュアル (Molecular cloning, a laboratory manual)、T. マニアスチス (T. Maniatis) 他著、コールドスプリングハーバー ラボラトリープレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press) 発行、2.78頁 (1989) ) により精製した。得られたファージをTM溶液に懸濁し、DNase IおよびRNase Aで処理後、20mM EDTA、50μg/ml Proteinase Kおよび0.5% SDSの混合液を加え65°C、1時間インキュベートした。これをフェノール抽出、ジエチルエーテル抽出後、エタノール沈殿によりDNAを沈殿させた。得られたDNAを70%エタノールで洗浄後乾燥し、TE溶液 (10mM EDTA含有10mM Tris-HCl緩衝液、pH8) に溶解した。

【0023】(f)挿入断片の塩基配列決定  
前項 (e) で調製した $\lambda$ gt11DNAをEcoRIで分解し、挿入断片を分離精製後、ベクターpBluescript (Stratagene) のEcoRI部位にクローニングした。この組換え体pBluescriptで大腸菌NM522XL1-Blueを形質転換した。形質転換細胞をF'選択後、ヘルバーファージVCSM13 (Stratagene) を感染させ終夜培養した。培養液を遠心分離し菌体を除き、これにPEG/NaClを加えファージを沈殿させた。沈殿をTE溶液に懸濁後、1本鎖DNAをフェノール抽出、エタノール沈殿により回収した。この1本鎖DNAの塩基配列を蛍光DNAシーケンサModel 373A (Applied Biosystems)、Taqダイプイマーサイクルシークエンシングキット (Applied Biosystems) を使用し決定した。決定した塩基配列の全長は3403塩基対であり、その配列は配列表配列番号2に記載した。GENBANK/EMBL DNA DataBaseを使用し、配列表配列番号2に記載した塩基配列を検索したが、同一の配列は存在しなかった。

【0024】(g) 遺伝子産物の解析  
配列表配列番号2に記載した遺伝子塩基配列から予想される配列表配列番号1に記載したアミノ酸配列の親水、疎水性値をカイト・ドーリトル (Kyte-Doolittle) 法 (ジャーナル オブ モレキュラーバイオロジー (J. Mol. Biol.)、第157巻、105~132頁 (1982) ) により算出し、図1に示す親水性、疎水性分布図を決定した。配列表配列番号1のアミノ酸533位から562位のC末端領域に膜結合型タンパク質に特徴的な20個以上の疎水性アミノ酸が連続する配列からなる疎水性領域が存在し、その配列を配列表配列番号7に示した。このような疎水性のアミノ酸

が連続している配列は、既知のMMPsには見られない配列である。配列表配列番号1に記載したアミノ酸配列を公知のMMPsのアミノ酸配列とその相同性を比較した結果、配列表配列番号1に示したアミノ酸配列は、MMPsファミリーと相同性を示した。特に、MMPsファミリーで非常に高度に保存されている前駆体と活性型の切断部位および活性部位はMT-MMPでもそれぞれ高い保存性を示した（配列表配列番号1、アミノ酸88位～97位およびアミノ酸番号112位～222位）。

## 【0025】実施例2 遺伝子発現

## (a) 組織での発現

ヒト心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓、各組織由来のポリ(A)+RNAをプロットしてあるメンブレンヒューマンマルチプルディッシュノーザンプロット（CLONTECH）に対し、<sup>32</sup>P標識した実施例1(c)項に記載したPCR産物Aをプローブとして用いてハイブリダイゼーションを行った。3×SSC(0.45M NaCl、0.045M trisodium citrate-2H<sub>2</sub>O、pH7.0)で湿らせたヒューマンマルチプルディッシュノーザンプロットのフィルターをプレハイブリダイゼーション溶液(0.75M NaCl、2.5mMEDTA、0.5×Denhardt's溶液、5.0%Formamideおよび1%SDS含有20mM Tris-HCl緩衝液、pH7.5)中で種やかに攪拌しながら2～3時間プレハイブリダイズした。次にハイブリダイゼーション溶液(プレハイブリダイゼーション溶液に10%Sodium Dextran、50μg/ml変性サケ精子DNAを加えた溶液)に熱変性したプローブを加えプレハイブリダイゼーション溶液と交換し、43℃で1晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション完了後、0.1%SDS含有2×SSC溶液で洗浄した。次にフィルターを0.1%SDS含有1×SSC溶液中に68℃、15分間置いた。このフィルターを風乾した後、X線フィルム(Kodak XR)と重ね-70℃で1週間オートラジオグラフィーを行った。MT-MMP遺伝子の転写産物のサイズは、何れの組織でも4.8kb.であった。現像したX線フィルムをデンシトメーターでトレースしシグナルの強度を測定した結果、MT-MMP遺伝子は、調べた組織中、肺、胎盤、腎臓で高い発現を認めた。

## 【0026】(b) 痂組織での発現

ヒト肺偏平上皮癌2例それぞれから正常組織と癌組織を採取し、全RNAをグアニジン-塩化セシウム法により抽出した。10μgの該RNAそれぞれを1%アガロース電気泳動後、ナイロンメンブレンにトランスファーし、実施例1(c)項に記載した<sup>32</sup>P標識したプローブを使用してハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションおよびオートラジオグラフィーのトレースは前項(a)と同様に行った。いずれのヒト肺偏平

上皮癌においても癌組織(図4 T参照)での発現が正常組織(図4 N参照)に比べ有意に高値を示した。

## 【0027】実施例3 モノクローナル抗体の調製

## (a) 抗原ポリペプチドの調製

配列表配列番号1に記載したMT-MMPのアミノ酸配列中より他のMMPファミリーとの相同性が低い特異的な配列として配列表配列番号8(配列表配列番号1アミノ酸番号160位～173位の配列)、同9(配列表配列番号1アミノ酸番号320位～333位の配列)および同10(配列表配列番号1アミノ酸番号498位～512位の配列)に記載した配列(以下それぞれポリペプチドA、ポリペプチドBおよびポリペプチドCと略記する)を選択した。これらのポリペプチドをペプチド合成機(ペプチドシンセサイザー9600、MilliGen/Bioscience)を用いFmoc-BOP法により合成し、N末端にシステインを導入した。合成した各ペプチドは高速液体クロマトグラフィーにより精製した。

## 【0028】(b) 各ポリペプチドとキーホールリンベットヘモシアニンの複合体の調製

2mgキーホールリンベットヘモシアニン(KLH)を1mlの0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)に溶解したものと1.85mgN-(ε-maleimidocaproyloxy)succinimideを200μlのジメチルホルムアミドに溶解したものと混合し、30℃、30分間反応させた。ついで、上記の混合液を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したPD-10(Pharmacia)でゲルろ過した。マレイミドが結合したKLHを分取し、1.5ml以下に濃縮した。マレイミドが結合したKLHに対し50倍モル量の前記(a)で合成した各ポリペプチドを1mlの0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解したものとをそれぞれ混合し、4℃、20時間インキュベートし、KLH-ポリペプチド複合体を調製した。

## 【0029】(c) 抗体産生細胞の調製

前項(b)で調製した3種類のポリペプチドA、ポリペプチドBおよびポリペプチドCとKLHとの複合体それぞれ250μgを完全フロイントアジュvantと共に8週令Balb/c雌マウスに腹腔内投与し、初回免疫した。18日後に0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)に溶解した各複合体200μgをそれぞれの初回免疫したマウスに腹腔内投与し、追加免疫した。さらに32日後に追加免疫時と同様に各複合体100μgを静脈内投与し、最終免疫とした。その3日後に脾臓を摘出し、脾細胞懸濁液を調製した。

## 【0030】(d) 細胞融合

8-アザグアニン耐性ミエローマ細胞SP2(SP2/O-Ag14)との融合は、オイ(Oi)らの方法(セレクテッドメソッドインセルラーイムノロジーSelected Method in Cellular

11

Immunology)、B. B. ミッセルとS. M. シーギ編 (ed. B. B. Mishell and S. M. Shiigi)、W. H. フリーマン アンドカンパニー (W. H. Freeman and Company) 発行、351~372頁 (1980) を若干改変して行った。以下では、ポリペプチドA-KLH複合体で免疫したマウス由来の有核脾細胞とミエローマ細胞SP2との融合に関して詳述する。

【0031】前項 (c) で調製した有核脾細胞 (生細胞率100%) それぞれとミエローマ細胞 (生細胞率100%) とを5:1の比率で以下の手順で融合した。ポリペプチドA脾細胞懸濁液とミエローマ細胞をそれぞれ RPMI 1640 培地で洗浄した。次に同じ培地に懸濁し、融合させるために有核脾細胞  $3 \times 10^8$  個とミエローマ細胞  $6 \times 10^7$  個を混合した。次に遠心分離により細胞を沈殿させ、上清を完全に吸引除去した。沈殿した細胞に37℃に加温したPEG 4000 液 (50% (w/v) ポリエチレングリコール4000含有RPMI 1640 培地) 2.0mlを1分間で滴下し、1分間攪拌し、細胞を再懸濁、分散させた。次に37℃に加温したRPMI 1640 培地2.0mlを1分間で滴下した。この操作をさらに1回繰り返した後、同培地14mlを2~3分間で常に攪拌しながら滴下し、細胞を分散させた。これを遠心分離し、上清を完全に吸引除去した。次にこの沈殿した細胞に37℃に加温したNS-1 培地 (除菌ろ過した15% (w/v) 仔牛胎児血清 (JRH Biosciences) 含有RPMI 1640 培地) 30mlを速やかに加え、大きい細胞塊を注意深くビベッティングで分散した。さらに同培地30mlを加えて希釈し、ポリスチレン製96穴マイクロウェルにウェル当り  $6.0 \times 10^5$  個/0.1mlの細胞を加えた。細胞を加えた上記マイクロウェルを7%炭酸ガス/93%空气中で温度37℃、湿度100%で培養した。

【0032】ポリペプチドB-KLH複合体で免疫したマウス由来脾細胞の場合では、脾細胞  $6.4 \times 10^8$  個とミエローマ細胞  $1.28 \times 10^8$  個を混合し、上記で使用したPEG 4000 液、RPMI 1640 培地、NS-1 培地をそれぞれ4.3ml、3.8.7ml、1.29ml用いた。ポリペプチドC-KLH複合体で免疫したマウス由来の脾細胞の場合、脾細胞  $6.8 \times 10^8$  個とミエローマ細胞  $1.36 \times 10^8$  個を混合し、PEG 4000 液、RPMI 1640 培地、NS-1 培地をそれぞれ4.5ml、4.0.5ml、1.35mlを使用した。

【0033】(e) 選択培地によるハイブリドーマの選択的増殖  
前項 (d) の培養開始後翌日 (1日目)、細胞にバストールビベットでHAT培地 (NS-1培地にヒポキサンチン (100 μM)、アミノブテリン (0.4 μM) およびチミジン (16 μM) を加えた培地) 2滴 (約0.50 ml) を加えた。2、3、5、8日目に培地の半分 (約0.1ml) を新しいHAT培地で置き換える。11日目に培地の半分を新しいHT培地 (アミノブテリン不含HAT培地) で置き換えた。14日目にハイブリドーマの生育が肉眼にて認められた全ウェルについて固相-抗体結合テスト法 (ELISA) により陽性ウェルを調べた。すなわち、ポリスチレン製96穴プレートを抗原としたポリペプチドA、BおよびCそれぞれでコートし、次に洗浄用PBS (0.05% Tween 20含有) を用いて洗浄して未吸着のペプチドを除いた。さらに各ウェルの未コート部分を1%BSAでブロックした。この各ウェルにハイブリドーマの生育が確認されたウェルの上清0.1mlを添加し、室温で約1時間静置した。2次抗体として西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス免疫グロブリンを加え、さらに室温で約1時間静置した。次に基質である過酸化水素とo-フェニレンジアミンを加え、発色の程度をマイクロプレート用吸光度測定機 (MRP-A4、東ソー) を用いて492nmの吸光度で測定した。

20

【0034】(f) ハイブリドーマのクローニング  
前項 (e) で得られた各抗原ペプチドに対する陽性ウェル中のハイブリドーマを、限界希釈法を用いてモノクローナ化した。すなわち、96穴マイクロウェルにハイブリドーマをウェル当り5個、1個、0.5個になるよう希釈し、それぞれ36穴、36穴、24穴に加えた。5日目、12日目に全ウェルに約0.1mlのNS-1 培地を追加した。クローニング開始後約2週間で、肉眼的に十分なハイブリドーマの生育を認め、コロニー形成陰性ウェルが50%以上である群について (e) に記載したELISAを行った。調べた全ウェルが陽性でない場合、抗体陽性ウェル中のコロニー数が1個のウェルを4~6個選択し、再クローニングを行った。最終的に表1および表2にまとめて示したように各ポリペプチドA、ポリペプチドBまたはポリペプチドCに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマがそれぞれ12個、20個、9個得られた。

【0035】(g) ハイブリドーマの培養とモノクローナル抗体の精製

得られた各ハイブリドーマ細胞をNS-1 培地で培養し、その上清から濃度10~100 μg/mlのモノクローナル抗体を得ることができた。また、得られたハイブリドーマを10<sup>7</sup>個を予め1週間前にブリストンを腹腔内投与したマウス (BALB/C系、雄、6週齢) に同じく腹腔内投与し、1~2週間後、腹水中からも4~7mg/mlのモノクローナル抗体を含む腹水を得ることができた。得られた腹水を40%飽和硫酸アンモニウムで塩析後、IgGクラスの抗体をプロテインAアフィジゲル (Bio-Rad) に吸着させ、0.1Mクエン酸緩衝液 (pH5) で溶出することにより精製した。

【0036】(h) モノクローナル抗体のクラス、サブ

12

1ml) を加えた。2、3、5、8日目に培地の半分 (約0.1ml) を新しいHAT培地で置き換える。11日目に培地の半分を新しいHT培地 (アミノブテリン不含HAT培地) で置き換えた。14日目にハイブリドーマの生育が肉眼にて認められた全ウェルについて固相-抗体結合テスト法 (ELISA) により陽性ウェルを調べた。すなわち、ポリスチレン製96穴プレートを抗原としたポリペプチドA、BおよびCそれぞれでコートし、次に洗浄用PBS (0.05% Tween 20含有) を用いて洗浄して未吸着のペプチドを除いた。さらに各ウェルの未コート部分を1%BSAでブロックした。この各ウェルにハイブリドーマの生育が確認されたウェルの上清0.1mlを添加し、室温で約1時間静置した。2次抗体として西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス免疫グロブリンを加え、さらに室温で約1時間静置した。次に基質である過酸化水素とo-フェニレンジアミンを加え、発色の程度をマイクロプレート用吸光度測定機 (MRP-A4、東ソー) を用いて492nmの吸光度で測定した。

10

【0037】(f) ハイブリドーマのクローニング  
前項 (e) で得られた各抗原ペプチドに対する陽性ウェル中のハイブリドーマを、限界希釈法を用いてモノクローナ化した。すなわち、96穴マイクロウェルにハイブリドーマをウェル当り5個、1個、0.5個になるよう希釈し、それぞれ36穴、36穴、24穴に加えた。5日目、12日目に全ウェルに約0.1mlのNS-1 培地を追加した。クローニング開始後約2週間で、肉眼的に十分なハイブリドーマの生育を認め、コロニー形成陰性ウェルが50%以上である群について (e) に記載したELISAを行った。調べた全ウェルが陽性でない場合、抗体陽性ウェル中のコロニー数が1個のウェルを4~6個選択し、再クローニングを行った。最終的に表1および表2にまとめて示したように各ポリペプチドA、ポリペプチドBまたはポリペプチドCに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマがそれぞれ12個、20個、9個得られた。

【0038】(g) ハイブリドーマの培養とモノクローナル抗体の精製  
得られた各ハイブリドーマ細胞をNS-1 培地で培養し、その上清から濃度10~100 μg/mlのモノクローナル抗体を得ることができた。また、得られたハイブリドーマを10<sup>7</sup>個を予め1週間前にブリストンを腹腔内投与したマウス (BALB/C系、雄、6週齢) に同じく腹腔内投与し、1~2週間後、腹水中からも4~7mg/mlのモノクローナル抗体を含む腹水を得ることができた。得られた腹水を40%飽和硫酸アンモニウムで塩析後、IgGクラスの抗体をプロテインAアフィジゲル (Bio-Rad) に吸着させ、0.1Mクエン酸緩衝液 (pH5) で溶出することにより精製した。

## クラスの決定

前述したELISAに従い、各ポリペプチドA、ポリペプチドBまたはポリペプチドCをコートしたマイクロタブレートに、(f)で得られたモノクローンの上清を加えた。次にPBSで洗浄後、アイソタイプ特異的ウサギ抗マウスIgG抗体(Zymed Lab.)を加えた。PBSにより洗浄後、西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG(H+L)を加え、基質として過酸化水素および2,2'-アジノージ(3-エチルベンゾチアゾリン酸)を用いてクラス、サブクラスを決定した。

## 【0037】(1)抗MT-MMPモノクローナル抗体の特異性

ヒト新生児線維芽細胞(NB1RGB)の培養上清中からそれぞれ精製した潜在型MMP-1(クリニカキミカアクタ(Clin. Chim. Acta)、第219巻、1~14頁(1993))、潜在型MMP-2(クリニカキミカアクタ(Clin. Chim. Acta)、第221巻、91~103頁(1993))および潜在型MMP-3(クリニカキミカアクタ(Clin. Chim. Acta)、第211巻、59~72頁(1992))、ヒト直腸癌細胞(Car-1)の培養上清から精製した潜在型MMP-7(キャンサー・リサーチ(Cancer Res.)、第50巻、7758~7764頁、(1990))、ヒト好中球より精製した潜在型MMP-8(バイオロジカルケミストリー・ホップ・セイラー(Biol. Chem. Hoppe-Seyler)、第371巻、サブルメント、295~304頁、(1990))並びにヒト線維芽細胞腫株(HT1080)の培養上清から精製した潜在型MMP-9(ザジャーナル・オブ・バイオロジカルケミストリー(J. Biol. Chem.)、第267巻、21712~21719頁、(1992))をそれぞれ抗原として使用し、前述の(e)に記載したELISAによりヒトMT-MMPペプチドと陽性反応を示す5種類の抗MT-MMPモノクローナル抗体(モノクローン番号113-5B7、113-15E7、114-1F1、114-2F2および118-3B1)の交差反応性を調べた。

【0038】すなわち、ポリスチレン製96穴プレートを使用し、各ウエルに精製した各MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8およびMMP-9をそれぞれ50ng/wellで加えコートした。洗浄用PBSで洗浄し未吸着の抗原を除去した後、各ウエルの未コート部分を3%スキムミルク含有PBSでブロックした。この各ウエルに各抗MT-MMPモノクローナル抗体それぞれを1μg/wellで加え、室温で約1時間静置した。プレートを洗浄後、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス免疫グロブリンを加えさらに室温で約1時間反応させた。次に基質である過

酸化水素とo-フェニレンジアミンを加え、発色の程度をマイクロプレート用吸光度測定機(MRP-A4、東ソー)を用いて492nmの吸光度で測定した。その結果、表3に示したように、抗MT-MMPモノクローナル抗体は何れも、供試したMT-MMP以外の精製MMPsと反応性を示さなかった。

## 【0039】

## 【表1】

ポリペプチド	モノクローン番号	サブクラス/類
A	114-1F2	γ1/κ
	114-2F2	γ1/κ
	114-3B7	γ1/κ
	114-5E4	γ1/κ
	114-6G8	γ1/κ
	114-8D10	γ1/κ
	114-9B3	μ/κ
	114-15E8	γ1/κ
	114-16C11	γ1/κ
	114-18E4	γ1/κ
	114-19F11	γ1/κ
	114-20B5	μ/κ
B	113-1E3	γ3/κ
	113-2B9	γ3/κ
	113-3F6	γ2b/κ
	113-4B7	γ3/κ
	113-5B7	γ3/κ
	113-7C6	γ2b/κ
	113-9G9	γ3/κ
	113-10F2	γ3/κ
	113-13G11	γ3/κ
	113-15E7	γ3/κ
	113-16B8	γ3/κ
	113-17G12	μ/κ
	113-19A10	μ/κ
	113-20G11	γ3/κ
	113-21B3	γ1/κ
	113-26D3	μ/κ
	113-44C1	γ1/κ
	113-46B7	γ1/κ
	113-53G5	μ/κ
	113-63E8	γ1/κ

## 【0040】

## 【表2】

15

表 2

ポリペプチド	モノクローン番号	サブクラス/鎖
C	118-3B1	$\gamma$ 2b/κ
	118-6F3	$\gamma$ 2b/κ
	118-8D11	$\gamma$ 1/κ
	118-9B11	$\gamma$ 1/κ
	118-13D11	$\alpha$ /κ
	118-18C12	$\gamma$ 1/κ
	118-20A3	$\gamma$ 2b/κ
	118-25C3	$\gamma$ 1/κ
	118-26F5	$\gamma$ 3/κ

\* [0041]

[表3]

16

10

表 3

モノクローン 番号	交差反応性					
	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-8	MMP-9
113-5B7	-	-	-	-	-	-
113-15E7	-	-	-	-	-	-
114-1F2	-	-	-	-	-	-
114-2F2	-	-	-	-	-	-
118-3B1	-	-	-	-	-	-

- : 反応せず

## 【0042】実施例4 遺伝子産物の発現と同定

実施例1 (f) で構築したMT-MMP遺伝子をクローニングした組換えpBluescriptからEcoR I切断により挿入断片を切り出し、真核細胞用発現ベクター-pSG5 (Stratagene) のEcoR Iサイトにクローニングした。該組換えpSG5をヒト線維芽細胞腫株HT1080にリン酸カルシウム法によりトランسفエクションした。すなわち、蒸留水に20  $\mu$ gの組換えpSG5、6.2  $\mu$ lの2M CaCl<sub>2</sub>を加え、次に2×HBSP溶液 (1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、10 mM KC1、280 mM NaClおよび1.2 mM Glucose含有50 mM HEPES緩衝液、pH 7.1) をチューブの底に加え全量が1 mlになるようにした。これを混合後、室温で30分程度放置し、沈殿形成を十分行った。沈殿をビベッティングにより分散し、HT1080細胞に滴下した後、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で約4時間インキュベートした。次に培地を除き、1.5%グリセリン溶液を加え1~3時間処理した後、グリセリンを吸引除去、PBSで洗浄後、<sup>35</sup>S-メチオニンを含む新鮮な培地を加えた。培養を継続し、細胞タンパク質を<sup>35</sup>Sで標識した。因みに、HT1080細胞におけるMT-MMP遺伝子の発現はノーザンプロット分析では検出できない。

【0043】細胞を溶解緩衝液 (1% Triton X-100、1% bovine hemoglobin、1 mM iodoacetamide、0.2 U t 50

rypsin inhibitor、1 mM PMSFおよび0.14 M NaCl含有0.01 M Tris-HCl緩衝液、pH 8) 中で4°C、1時間インキュベートした。細胞溶解液を遠心分離し、上清を回収した。上清に実施例3で得られたモノクローナル抗体をカップリングさせたセファロース-4 B (Pharmacia) を加え、4°Cで2時間攪拌しながらインキュベートし、免疫沈降を行った。免疫沈降には実施例3で得られたポリペプチドAに対する12個のモノクローナル抗体のうち非特異的反応性の低いモノクローン番号 114-1F2および114-2F2 (受託番号 FERM BP-4743) の2種類をそれぞれ使用した。次に、遠心分離により免疫沈降させたモノクローナル抗体をカップリングしたセファロース-4 Bを沈殿させ、洗浄液 (1% Triton X-100、1% bovine hemoglobinおよび0.14 M NaCl含有0.01 M Tris-HCl、pH 8) で3回洗浄し、最後に0.05 M Tris-HCl緩衝液、pH 6.8で洗浄した。この洗浄したモノクローナル抗体をカップリングしたセファロース-4 BにSDSポリアクリルアミド電気泳動用サンプル緩衝液を加え、100°Cで5分間加熱した後、SDSポリアクリルアミド電気泳動を行った。泳動後のゲルをX線フィルム (Kodak X R) と重ね-70°Cで1週間オートラジオグラフィーを行った後、現像したX線フィルムをデンシトメーターでトレースレシグナルの強度を測定した。使用した抗MT

17

-MMPモノクローナル抗体モノクローン番号114-1F2および114-2F2はいずれも、63kDaのタンパク質を免疫沈降した。対照としたMT-MMP遺伝子を含まないベクターpSG5のみをトランスフェクションした細胞では、抗MT-MMPモノクローナル抗体モノクローン番号114-1F2および114-2F2で63kDaタンパク質は免疫沈降されなかった。免疫沈降で検出されたタンパク質の分子量63kDaは、配列表配列番号1に記載したアミノ酸配列から算出される分子量65.78kDaとほぼ一致した。さらに、配列表配列番号1に記載したアミノ酸配列のアミノ酸13位から101位までを欠失した変異体MT-MMP発現プラスミドを作成し、前述と同様HT1080細胞にトランスフェクションし、免疫沈降を行った。変異体MT-MMP遺伝子を導入したHT1080細胞では、63kDaタンパク質は検出されず、55kDaタンパク質を検出した。この分子量は、導入した欠失から予想される分子量と一致した。

【0044】

【実験例】

(a) MT-MMPの発現による潜在型MMP-2の活性化

実施例4で構築したMT-MMP遺伝子をクローニングした組換えpSG5あるいはコントロールとしてベクターpSG5単独と同じく実施例4に記載したリン酸カルシウム法によりHT1080細胞、あるいはマウス胎児由来線維芽細胞NIH3T3にトランスフェクションした。ただし、<sup>35</sup>S-メチオニン含有新鮮培地の代わりに、通常の新鮮培地を使用した。なお、HT1080細胞およびNIH3T3細胞は、何れも潜在型MMP-2および潜在型MMP-9を分泌しており(図6中の6.6kDaおよび97.4kDaのバンドにそれぞれ相当)、また、MT-MMP遺伝子をトランスフェクションした細胞では、MT-MMPが発現していることを免疫沈降実験により確認した(実施例4参照)。

【0045】得られたトランスフェクタントを無血清培地中で24時間培養し、回収した培養上清をザイモグラフィーに供試した。培養上清をSDSポリアクリルアミド電気泳動用緩衝液(非還元)と混和後4℃で一晩放置した後、1mg/mlのカゼイン含有10%ポリアクリルアミドゲルを用い、電流20mA、4℃で電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルを2.5% Triton X-100含有ゼラチナーゼ用緩衝液(5mM CaCl<sub>2</sub>、1μM ZnSO<sub>4</sub>、含有Tris-HCl、pH 7.6)で15分間ゆっくり振盪させながら洗浄し、この操作を2回繰り返した。次にゲルを1% Triton X-100含有ゼラチナーゼ用緩衝液中に浸し、37℃で一晩放置した。緩衝液を廃棄し、ゲルを0.02%クマシープリリアントブルーR(50%メタノール-10%酢酸に溶解)で1時間染色後、脱色液(5%メタノ

10

20

30

40

50

18

ール-7.5%酢酸)に浸し脱色した。

【0046】図6に示すように、MT-MMP遺伝子をトランスフェクションしたHT1080細胞では、新たに64kDaと62kDaのバンドが生じ、潜在型MMP-2の活性化が確認された。この活性型MMP-2は、細胞を100μg/mlのコンカナバリンAで処理して誘導される活性型MMP-2分子と同じ分子量を示し、また抗MMP-2モノクローナル抗体と特異的に反応した。この活性化は、ベクター単独をトランスフェクションしたコントロールでは観察されなかった。一方、潜在型MMP-9は、コントロールの細胞と同様に分子量の変化は認められず、活性化は認められなかった。このMT-MMPの発現に伴う潜在型MMP-2の活性化は、MT-MMP遺伝子をトランスフェクションしたNIH3T3細胞でも観察された。

【0047】(b) MT-MMP発現細胞膜画分による潜在型MMP-2の活性化

前項(a)の記載と同様にMT-MMP遺伝子をクローニングした組換えpSG5あるいはコントロールとしてベクターpSG5単独をリン酸カルシウム法によりアフリカミドリザル腎由来細胞COS-1にトランスフェクションした。得られたトランスフェクタントからストロンジン(Strongin)らの方法(ザジャーナルオープバイオロジカルケミストリー(J. Biol. Chem.)、第268巻、14033~14039頁(1993))に従い、細胞膜画分を調製した。

【0048】トランスフェクタントをPBSで洗浄後、遠心により細胞を集め8.5%Sucrose)50mM NaCl、10mM N-ethylmaleimide、10μg/ml aprotinin、1μg/ml pepstatinA、1μg/ml leupeptin、1mM phenylmethylsulfonyl fluoride含有25mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4)に懸濁した。細胞懸濁液をDounce homogenizerで破碎し、破碎液を遠心分離(3000×g、10分間、4℃)した。得られた上清をさらに超遠心分離(100,000×g、2時間)し、沈殿を50mM NaCl、10mM N-ethylmaleimide、10μg/ml aprotinin、1μg/ml pepstatinA、1μg/ml leupeptin、1mM phenylmethylsulfonyl fluoride含有25mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4)に懸濁した。この懸濁液を段階的ショ糖密度勾配遠心(20、30、50、60% Sucrose溶液、100,000×g、2時間、4℃)で分画し、生じた細胞膜画分のバンドを回収した。この画分を再度超遠心分離(100,000×g、2時間)により沈殿させた後、0.1mM CaCl<sub>2</sub>、0.25% Triton X-100含有25mM HEPES/KOH

19

(pH 7.5) に懸濁し、タンパク質濃度 1~2 mg /m l となるように調整した。この懸濁液を超遠心分離 (100,000/g, 1,5 時間、4°C) し不溶残渣を除き得られた上清を細胞膜画分とした。

【0049】ベクター pSG5 単独または MT-MMP 遺伝子をトランスフェクションした COS-1 細胞および無処理の COS-1 細胞からそれぞれ調製した細胞膜画分 (タンパク質含量 20 μg) を HT1080 細胞の培養上清と 37°C で 2 時間インキュベートした。これら試料を用いて前項 (a) に記載したザイモグラフィーを行った。その結果、MT-MMP 遺伝子をトランスフェクションした COS-1 細胞由来の細胞膜画分を用いた場合のみ、新たな 64 kDa と 62 kDa のバンドが出現し、HT1080 細胞の培養上清中に存在する潜在型 MMP-2 の活性化が観察された (図 7 参照)。この潜在型 MMP-2 の活性化は、組換え TIMP-2 の添加により阻害された。この結果から、細胞膜上に発現した MT-MMP による潜在型 MMP-2 の活性化が示された。

【0050】(c) in vitro における MT-MMP 発現による浸潤能の促進  
細胞の浸潤能の測定は、ボイデン チャンバー (Boyden Chamber) 法 (キャンサー リサーチ (Cancer Res.)、第 47 卷、3239~3245 頁 (1987)) を改変して行い、操作はバイオコート マトリゲル インベーション チャンバー (Becton Dickinson) の操作方法に従った。

10

20

【0051】前述の (a) の記載と同様に MT-MMP 遺伝子をクローニングした組換え pSG5 あるいはコントロールとしてベクター pSG5 単独をリン酸カルシウム法により HT1080 細胞、あるいは NIH3T3 細胞にトランスフェクションした。これらの宿主細胞はいずれも潜在型 MMP-2 を分泌している。得られたトランスフェクタントを 0.1% BSA 含有 DMEM 培地に懸濁し、2 × 10<sup>5</sup> 個の細胞をバイオコート マトリゲル インベーション チャンバー中の未コートフィルター (ポアサイズ 8 μm) あるいは予め膨潤させたマトリゲルコートフィルター上に接種した。24 時間、37°C 炭酸ガスインキュベーターで培養した後、フィルターを 10 秒間メタノール中に浸し固定した。次にヘマトキシリジンで 3 分間水洗後、エオジンで 10 秒間染色し、フィルター下面に浸潤した細胞数を光学顕微鏡下 (400 倍) で計測した。

【0052】MT-MMP 遺伝子をトランスフェクションした HT1080 細胞および NIH3T3 細胞では、いずれもコントロールのベクター単独をトランスフェクションした細胞に比べ、2 倍以上の浸潤した細胞が観察された (図 8 マトリゲル参照)。すなわち、MT-MMP の発現により細胞の浸潤能が上昇したことが示された。また、この測定系に 10 μg/m l の組換え TIMP-2 を添加すると明らかに細胞の浸潤能が抑制されることが認められた (図 8 マトリゲル + rTIMP-2 参照)。

【0053】

【配列表 1】

21

配列番号：1

配列の長さ：582

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖上

配列の種類：タンパク質

配列

Met Ser Pro Ala Pro Arg Pro Ser Arg Cys Leu Leu Leu Pro Leu

1 5 10 15

Leu Thr Leu Gly Thr Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser Ala Gln Ser

20 25 30

Ser Ser Phe Ser Pro Glu Ala Trp Leu Gln Gln Tyr Gly Tyr Leu

35 40 45

Pro Pro Gly Asp Leu Arg Thr His Thr Gln Arg Ser Pro Gln Ser

50 55 60

Leu Ser Ala Ala Ile Ala Ala Met Gln Lys Phe Tyr Gly Leu Gln

65 70 75

Val Thr Gly Lys Ala Asp Ala Asp Thr Met Lys Ala Met Arg Arg

80 85 90

Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp Lys Phe Gly Ala Glu Ile Lys Ala

95 100 105

Asn Val Arg Arg Lys Arg Tyr Ala Ile Gln Gly Leu Lys Trp Gln

110 115 120

His Asn Glu Ile Thr Phe Cys Ile Gln Asn Tyr Thr Pro Lys Val

125 130 135

Gly Glu Tyr Ala Thr Tyr Glu Ala Ile Arg Lys Ala Phe Arg Val

140 145 150

Trp Glu Ser Ala Thr Pro Leu Arg Phe Arg Glu Val Pro Tyr Ala

155 160 165

[0054]

【配列表2】

23

24

配列番号：1 (つづき)

Tyr Ile Arg Glu Gly His Glu Lys Gln Ala Asp Ile Met Ile Phe  
 170 175 180  
 Phe Ala Glu Gly Phe His Gly Asp Ser Thr Pro Phe Asp Gly Glu  
 185 190 195  
 Gly Gly Phe Leu Ala His Ala Tyr Phe Pro Gln Pro Asn Ile Gly  
 200 205 210  
 Gly Asp Thr His Phe Asp Ser Ala Glu Pro Trp Thr Val Arg Asn  
 215 220 225  
 Glu Asp Leu Asn Gly Asn Asp Ile Phe Leu Val Ala Val His Glu  
 230 235 240  
 Leu Gly His Ala Leu Gly Leu Glu His Ser Ser Asp Pro Ser Ala  
 245 250 255  
 Ile Met Ala Pro Phe Tyr Gln Trp Met Asp Thr Glu Asn Phe Val  
 260 265 270  
 Leu Pro Asp Asp Asp Arg Arg Gly Ile Gln Gln Leu Tyr Gly Gly  
 275 280 285  
 Glu Ser Gly Phe Pro Thr Lys Met Pro Pro Gln Pro Arg Thr Thr  
 290 295 300  
 Ser Arg Pro Ser Val Pro Asp Lys Pro Lys Asn Pro Thr Tyr Gly  
 305 310 315  
 Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asp Thr Val Ala Met Leu Arg  
 320 325 330  
 Gly Glu Met Phe Val Phe Lys Lys Arg Trp Phe Trp Arg Val Arg  
 335 340 345  
 Asn Asn Gln Val Met Asp Gly Tyr Pro Met Pro Ile Gly Gln Phe  
 350 355 360  
 Trp Arg Gly Leu Pro Ala Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Glu Arg Lys  
 365 370 375

[0055]

[配列表3]

25

26

配列番号：1 (つづき)

Asp	Gly	Lys	Phe	Val	Phe	Phe	Lys	Gly	Asp	Lys	His	Trp	Val	Phe
380									385					390
Asp	Glu	Ala	Ser	Leu	Glu	Pro	Gly	Tyr	Pro	Lys	His	Ile	Lys	Glu
395									400					405
Leu	Gly	Arg	Gly	Leu	Pro	Thr	Asp	Lys	Ile	Asp	Ala	Ala	Leu	Phe
410									415					420
Trp	Met	Pro	Asn	Gly	Lys	Thr	Tyr	Phe	Phe	Arg	Gly	Asn	Lys	Tyr
425									430					435
Tyr	Arg	Phe	Asn	Glu	Glu	Leu	Arg	Ala	Val	Asp	Ser	Glu	Tyr	Pro
440									445					450
Lys	Asn	Ile	Lys	Val	Trp	Glu	Gly	Ile	Pro	Glu	Ser	Pro	Arg	Gly
455									460					465
Ser	Phe	Met	Gly	Ser	Asp	Glu	Val	Phe	Thr	Tyr	Phe	Tyr	Lys	Gly
470									475					480
Asn	Lys	Tyr	Trp	Lys	Phe	Asn	Asn	Gln	Lys	Leu	Lys	Val	Glu	Pro
485									490					495
Gly	Tyr	Pro	Lys	Ser	Ala	Leu	Arg	Asp	Trp	Met	Gly	Cys	Pro	Ser
500									505					510
Gly	Gly	Arg	Pro	Asp	Glu	Gly	Thr	Glu	Glu	Glu	Tbr	Glu	Val	Ile
515									520					525
Ile	Ile	Glu	Val	Asp	Glu	Glu	Gly	Gly	Ala	Val	Ser	Ala	Ala	
530									535					540
Ala	Val	Val	Leu	Pro	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Ala	Val	
545									550					555
Gly	Leu	Ala	Val	Phe	Phe	Arg	Arg	Asp	His	Gly	Thr	Pro	Arg	Arg
560									565					570
Leu	Leu	Tyr	Cys	Gln	Arg	Ser	Leu	Leu	Asp	Lys	Val			
575									580					

[0056]  
[配列表4]

27

28

配列番号：2  
配列の長さ：3403

\* [0057]  
【配列表5】

配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：cDNA to mRNA

起源 10

生物名：ヒト

組織の種類：胎盤

\*

配列番号：2 (つづき)

AGTCAGTGCCTACC	GAAGACAAAGGCC	CCCAGGGAGTCCC	TGGGACCCCAGGGC	60			
TGGGCCCCCCCC				AGCCACACTGCC	CTGACCCCTGGTCT	CGGACCATGTCTCCC	120
				MetSerPro			
GCCCCAAGACCTCC	CGTTCTCTCTGCTC	CCCCTGCTCACGCTC	GGCACCGCGCTCGCC	180			
AlaProArgProSer	ArgCysLeuLeuLeu	ProLeuLeuThrLeu	GlyThrAlaLeuAla				
5	10	15	20				
TCCCTCGGCTCGCC	CAAAGCAGCAGCTTC	ACCCCCGAAGCCTGG	CTACAGCAATATGCC	240			
SerLeuGlySerAla	GlnSerSerSerPhe	SerProGluAlaTrp	LeuGlnGlnTyrGly				
25	30	35	40				
TACCTGCCTCCCCG	GACCTACCTACCCAC	ACACACGGCTCACCC	CAGTCACTCTCAGCG	300			
TyrLeuProProGly	AspLeuArgThrHis	ThrGlnArgSerPro	GlnSerLeuSerAla				
45	50	55	60				
GCCATCCCTGCCATG	CAGAACTTTACGGC	TTGCAACTAACAGGC	AAAGCTGATGCACAC	360			
AlaIleAlaAlaMet	GlnLysPheTyrGly	LeuGlnValThrGly	LysAlaAspAlaAsp				
65	70	75	80				
ACCATGAAGGCCATG	AGGGCCCCCGATGT	GGTGTCCAGACAAC	TTTGGGCTGACATC	420			
ThrMetLysAlaMet	ArgArgProArgCys	GlyValProAspLys	PheGlyAlaGluIle				
85	90	95	100				
AAGGCCAATGTCGA	AGGAAGCGCTACCCC	ATCCAGGGCTCTCAA	TGCCAACATAATCAA	480			
LysAlaAsnValArg	ArgLysArgTyrAla	IleGlnGlyLeuLys	TrpGlnHisAsnGlu				
105	110	115	120				
ATTACTTCTGCATC	CAGAAATTACACCCCC	AAGGTGGCCGAGTAT	GGCACATACGAGGCC	540			
IleThrPheCysIle	GlnAsnTyrThrPro	LysValGlyGluTyr	AlaThrTyrGluAla				
125	130	135	140				
ATTCGCAAGGGTTC	CGCGTGTGGAGACT	GGCACACCACTGGCC	TTCCCCGAGGTGCC	600			
IleArgLysAlaPhe	ArgValTrpGluSer	AlaThrProLeuArg	PheArgGluValPro				
145	150	155	160				
TATGCCCTACATCCGT	GAGGGCCATGAGAAG	CAGGCCGACATCATG	ATCTTCTTGGCCAC	660			
TyrAlaTyrIleArg	GluGlyHisGluLys	GlnAlaAspIleNet	IlePhePheAlaGlu				
165	170	175	180				

[0058]

【配列表6】

29

30

配列番号：2 (つづき)

GGCTTCCATGGCGAC AGCACGCCCTTCGAT GGTGAGGGGGCTTC CTGGCCCATGCCTAC	720
GlyPhellisGlyAsp SerThrProPheAsp GlyGluGlyGlyPhe LeuAlaLisAlaTyr	
185 190 195 200	
TTCCCAAGCCCCAAC ATTCCGAGGAGACACC CACTTCACTCTCCC GAGCCTGGACTCTC	780
PheProGlyProAsn IleGlyGlyAspThr HisPheAspSerAla GluProTrpThrVal	
205 210 215 220	
ACGAATGAGGATCTG AATGGAATGACATC TTCTGGTGGCTGTC CACGAGCTGGCCAT	840
ArgAsnGluAspLeu AsnGlyAsnAspIle PheLeuValAlaVal HisGluLeuGlyHis	
225 230 235 240	
CCCTGGGCTCGAC CATTCACGTACCCCC TCGGCCATCATGGCA CCCTTTTACCACTGCG	900
AlaLeuGlyLeuGlu HisSerSerAspPro SerAlaIleMetAla ProPheTyrGlnTrp	
245 250 255 260	
ATGGACACGGAGAAT TTGTGCTTCCCGAT GATGACCGCCGGGGC ATCCAGCAACTTAT	960
MetAspThrGluAsn PheValLeuProAsp AspAspArgArgGly IleGlnGlnLeuTyr	
265 270 275 280	
GGGGGTGAGTCAGGG TTCCCCACCAAGATG CCCCCCTCAACCCAGG ACTACCTCCGGCCT	1020
GlyGlyGluSerGly PheProThrLysMet ProProGlnProArg ThrThrSerArgPro	
285 290 295 300	
TCTGTTCTGATAAA CCCAAAAACCCCACC TATGGGCCAACATC TCTGACGGAACTTT	1080
SerValProAspLys ProLysAsnProThr TyrGlyProAsnIle CysAspGlyAsnPhe	
305 310 315 320	
GACACCGTGGCCATG CTCCGAGGGGAGATG TTGCTCTCAAGAAG CGCTGGTTCTGGCGG	1140
AspThrValAlaMet LeuArgGlyGluMet PheValPheLysLys ArgTrpPheTrpArg	
325 330 335 340	
CTGACCAATAACCAA CTGATGGATGGATAC CCAATGCCATTGGC CAGTTCTGGGGGGC	1200
ValArgAsnAsnGln ValMetAspGlyTyr ProMetProIleGly GlnPheTrpArgGly	
345 350 355 360	
CTGCCTGGTCCATC AACACTGCCCTACGAG AGGAAGGATGGCAAA TTCTCTTCTTCAAA	1260
LeuProAlaSerIle AsnThrAlaTyrGlu ArgLysAspGlyLys PheValPhePheLys	
365 370 375 380	
GGAGACAAGCATTGG GTCTTGTGAGGGC TCCCTGGAACCTGGC TACCCCAAGCACATT	1320
GlyAspLysHisTrp ValPheAspGluAla SerLeuGluProGly TyrProLysHisIle	
385 390 395 400	

[0059]

【配列表7】

31

32

配列番号：2 (つづき)

AAGGAGCTGGGGCA	GGGCTGCCTACCCAC	AAGATTGATGCTGCT	CTCTTCTGGATCCCC	1380
LysGluLeuGlyArg	GlyLeuProThrAsp	LysIleAspAlaAla	LeuPheTrpMetPro	
405	410	415	420	
AATGGAAAGACCTAC	TICTTCCGTGAAAC	AACTACTACCGTTTC	AACCAAGACCTCAGG	1440
AsnGlyLysThrTyr	PhePheArgGlyAsn	LysTyrTyrArgPhe	AsnGluGluLeuArg	
425	430	435	440	
CCAGTGGATAGCGAG	TACCCCAAGAACATC	AAACTCTGGGAAGGG	ATCCCTGAGTCTCCC	1500
AlaValAspSerGlu	TyrProLysAsnIle	LysValTrpGluGly	IleProGluSerPro	
445	450	455	460	
AGAGGGTCATTCACTG	GGCAGGGATGAAGTC	TTCACTTACTTCTAC	AAGGGAAACAAATAC	1560
ArgGlySerPheMet	GlySerAspGluVal	PheThrTyrPheTyr	LysGlyAsnLysTyr	
465	470	475	480	
TGGAAATTCAACAAAC	CAGAAGCTGAAGGTA	GAACCGGGCTACCCC	AAGTCAGCCCTGAGG	1620
TrpLysPheAsnAsn	GlnLysLeuLysVal	GluProGlyTyrPro	LysSerAlaLeuArg	
485	490	495	500	
CACTCGATGGGCTGC	CCATCGGGAGGGCGG	CCGGATGAGGGGACT	GAGGAGGAGACGGAG	1680
AspTrpMetGlyCys	ProSerGlyGlyArg	ProAspGluGlyThr	GluGluGluThrGlu	
505	510	515	520	
GTGATCATCATTGAG	GTGGACGAGGACGGC	GGGGGGGGCGGTGAGC	GGGGCTGGGGCTGGTC	1740
ValIleIleGlu	ValAspGluGluGly	GlyGlyAlaValSer	AlaAlaAlaValVal	
525	530	535	540	
CTGCCCCGTGCTGCTG	CTGCTCCTGGTGGCTG	GGGGTGGGGCTTGCA	CTCTTCTTCTTCAGA	1800
LeuProValLeuLeu	LeuLeuLeuValLeu	AlaValGlyLeuAla	ValPhePhePheArg	
545	550	555	560	
CCCCATGGGACCCCC	AGCCGACTGCTCTAC	TGCCAGCGTTCCCTG	CTGGACAAGCTCTGA	1860
ArgHisGlyThrPro	ArgArgLeuLeuTyr	CysGlnArgSerLeu	LeuAspLysVal...	
565	570	575	580	
CCCCCATCCCCGGC	CCGCCCCACTCCTACC	ACAAGGACTTGCCT	CTGAAGGCCAGTGGC	1920
ACGAGGTGGTGGTGG	GTGGGCTGCTCCAT	CGTCCCAGCCCCCT	CCCCGGAGGCTCCCT	1980

[0060]

【配列表8】

33

配列番号：2（つづき）

34

GCTTCTCTCTGCCCC CTGGCTGGCTCTT CACCCCTGACGGCTC CCTCCCTCTGGCCC 2040  
 GGCATTCATCTTCC CTAGATAGGTCCCCCT GAGGGCTGACTCCGA CGGGGGCCCTTCCA 2100  
 CCTCTGCCCCCTCAG CGGAACCCCTGAGCT TTCTCTCTCCAGC CCCATCTGAATCTGT 2160  
 TGGGGCTCTGCACT TGAAGGCAGGACCT CAGACCTCGCTGGTA AAGGTCAAATCGGT 2220  
 CATCTGCTCTTTC CATCCCTGACATAC CTTAACCTCTGAAC TCTACCTCAGGAGCC 2280  
 TCTGGGAACCTCAG CCTGAAAGCCAG GTCGAACCAATTGGC AGCCTCTCACTACTC 2340  
 TTCTGGCTAAAGG AATCTAAATTTCTTG AGGGTAGAGACCTG AGACAGTGTGAGGG 2400  
 CTGGGGACTGCCAAG CCACCCCTAAAGACCTT CGGAGGAAACTCAG AGAGGGCTTCGTT 2460  
 CTCACTCAGTCAGT CCCTCCGAATCTTC CTCTGGCTCACCTAC CCCAGGGAACTTCCA 2520  
 AGGAAGGGACCCCTCAG CCACCTGGGACTAAG TGGGCAGAAGAACC CTTGGCAGCCCTGT 2580  
 CCTCTCGAATGTTAG CCTTGGATGGGGCTT TCACACTTACAAGAG CTGAAACCAGGGGTG 2640

【0061】

【配列表9】

35

配列番号：2（つづき）

CAGCTCTCAGCTAGG GTGGGGCCCGTGGCA GAGCCCGGGTCAGA GGCCTGGGGTGAGC 2700  
 CTTAACCCACAGAG AAAGAACCTTCCCA AACTCAGCCAGCTGG CGCTGAGGCCCCAAC 2760  
 CCAGAACAGCCAGAG GGGGCAGGAGGGAC CAAAACGAAATGA GGACGTCACCAAGCA 2820  
 TTGGAAGGCTGGGC CCGGCACCCACGTTA AAGCTAACACGGGC CATCAGGCTGGCTT 2880  
 GTGAGCTCTCAGGA AGGGCCCTGAGGAAG GCACACTTGTCTCTG TTGGTCCCTGTCTT 2940  
 GCTCCCAGCCAGGG TGGAGGGAAAGGTA CGCCACGCCAGAGAA GGAGCACAGAAAGGCA 3000  
 CACAAACGAGGAATG AGGGCTTCAACGAGA GCCCACAGGGCTGG CTGGCCACGGCTGTCC 3060  
 CGGCCTGCTCACCAT CTCAGTGAGGACAG CAGCTGGGCTGCTT AGGCTGGTCCACCC 3120  
 TTCCCTGGTCCAGC ACCECTCAAGCTGT CTCACAGTGGCTG CCCTCTCGCTCCCC 3180  
 ACCCAGCCCACCCAT TGAAGTCTCTTGGG TCCCAAAGGTGGCA TGGTACCGGGGACTT 3240  
 CGGACAGTGAGACCC ACTGGAGGGAGGAAG AGGAGAGGGATGTGG CGGGGTGGGCCACGG 3300  
 GTAGGGAAATGGG TGAACGGTGTGGCA GTTCGGCTAGATTTC TGTCTTGTGTTTTT 3360

[0062]

TTTCTTTCTTAAAT CTATACTTTTATTAT ATTATTATATAT

30 【配列表11】

【配列表10】

配列番号：3

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

40

配列

Pro Arg Cys Cys Val Pro Asp

37

配列番号：4

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Gly Asp Ala His Phe Asp Asp Asp Glu

1

5

【配列表12】

配列番号：5

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

[0063] CC(C/A)(C/A)C(C/A/C)TG(T/C)(C/C) C(G/A/C)(G/A)(A/T)(G/C/T)CC(T/A)GA  
【配列表13】

配列番号：6

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

(T/C)TC(G/A)T(G/C)(G/A/C)TC(G/A) TC(G/A)AA(G/A)TG(G/A)(G/A)  
(C/A/T)(C/A)TC(T/C)

【配列表14】

(21)

特開平7-303482

39

40

配列番号：7

配列の長さ：27

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Gly Gly Gly Ala Val Ser Ala Ala Ala Val Val Leu Pro Val Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Val Leu Ala Val Gly Leu Ala Val Phe Phe Phe

20 25

【配列表15】

配列番号：8

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Arg Glu Val Pro Tyr Ala Tyr Ile Arg Glu Gly His Glu Lys

1 5 10

【0064】

【配列表16】

配列番号：9

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Gly Asn Phe Asp Thr Val Ala Met Leu Arg Gly Glu Met

1 5 10

【配列表17】

41

配列番号：10

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Pro Lys Ser Ala Leu Arg Asp Trp Met Gly Cys Pro Ser Gly Gly

1

5

10

15

【図面の簡単な説明】

【図1】MT-MMPのアミノ酸配列のカイト・ドーリトル法による親水性、疎水性分布図である。

【図2 A】MT-MMPのアミノ酸配列と公知のMMPファミリー (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11) のアミノ酸配列との配列上の相異性を比較した図である。各図中の記号は、それぞれアミノ酸を表し、AはAla、CはCys、DはAsp、EはGlu、FはPhe、GはGly、HはHis、IはIle、KはLys、LはLeu、MはMet、NはAsn、PはPro、QはGln、RはArg、SはSer、TはThr、VはVal、WはTrp、YはTyrに対応する。これらの2A～2Hの図は一体となって1つの図を構成する。

【図2 B】MT-MMPのアミノ酸配列と公知のMMPファミリー (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11) のアミノ酸配列との配列上の相異性を比較した図である。各図中の記号は、それぞれアミノ酸を表し、AはAla、CはCys、DはAsp、EはGlu、FはPhe、GはGly、HはHis、IはIle、KはLys、LはLeu、MはMet、NはAsn、PはPro、QはGln、RはArg、SはSer、TはThr、VはVal、WはTrp、YはTyrに対応する。これらの2A～2Hの図は一体となって1つの図を構成する。

【図2 C】MT-MMPのアミノ酸配列と公知のMMPファミリー (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11) のアミノ酸配列との配列上の相異性を比較した図である。各図中の記号は、それぞれアミノ酸を表し、AはAla、CはCys、DはAsp、EはGlu、FはPhe、GはGly、HはHis、IはIle、KはLys、LはLeu、MはMet、NはAsn、PはPro、QはGln、RはArg、SはSer、TはThr、VはVal、WはTrp、YはTyrに対応する。これらの2A～2Hの図は一体となって1

20

30

40

50

つの図を構成する。

【図2 D】MT-MMPのアミノ酸配列と公知のMMPファミリー (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11) のアミノ酸配列との配列上の相異性を比較した図である。各図中の記号は、それぞれアミノ酸を表し、AはAla、CはCys、DはAsp、EはGlu、FはPhe、GはGly、HはHis、IはIle、KはLys、LはLeu、MはMet、NはAsn、PはPro、QはGln、RはArg、SはSer、TはThr、VはVal、WはTrp、YはTyrに対応する。これらの2A～2Hの図は一体となって1つの図を構成する。

【図2 E】MT-MMPのアミノ酸配列と公知のMMPファミリー (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11) のアミノ酸配列との配列上の相異性を比較した図である。各図中の記号は、それぞれアミノ酸を表し、AはAla、CはCys、DはAsp、EはGlu、FはPhe、GはGly、HはHis、IはIle、KはLys、LはLeu、MはMet、NはAsn、PはPro、QはGln、RはArg、SはSer、TはThr、VはVal、WはTrp、YはTyrに対応する。これらの2A～2Hの図は一体となって1つの図を構成する。

【図2 F】MT-MMPのアミノ酸配列と公知のMMPファミリー (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11) のアミノ酸配列との配列上の相異性を比較した図である。各図中の記号は、それぞれアミノ酸を表し、AはAla、CはCys、DはAsp、EはGlu、FはPhe、GはGly、HはHis、IはIle、KはLys、LはLeu、MはMet、NはAsn、PはPro、QはGln、RはArg、SはSer、TはThr、VはVal、WはTrp、YはTyrに対応する。これらの2A～2Hの図は一体となって1つの図を構成する。

【図2 G】MT-MMPのアミノ酸配列と公知のMMP

42

ファミリー (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11) のアミノ酸配列との配列上の相同性を比較した図である。各図中の記号は、それぞれアミノ酸を表し、AはAla, CはCys, DはAsp, EはGlu, FはPhe, GはGly, HはHis, IはIle, KはLys, LはLeu, MはMet, NはAsn, PはPro, QはGln, RはArg, SはSer, TはThr, VはVal, WはTrp, YはTyrに対応する。これらの2A~2Hの図は一体となって1つの図を構成する。

【図2H】MT-MMPのアミノ酸配列と公知のMMPファミリー (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11) のアミノ酸配列との配列上の相同性を比較した図である。各図中の記号は、それぞれアミノ酸を表し、AはAla, CはCys, DはAsp, EはGlu, FはPhe, GはGly, HはHis, IはIle, KはLys, LはLeu, MはMet, NはAsn, PはPro, QはGln, RはArg, SはSer, TはThr, VはVal, WはTrp, YはTyrに対応する。これらの2A~2Hの図は一体となって1つの図を構成する。

【図3】ノーザンプロット分析による各種のヒト組織中のMT-MMP mRNAの発現を相対的に示したものである。

【図4】ノーザンプロット分析によるヒト肺偏平上皮癌2例の正常部および癌部におけるMT-MMP mRNAの発現を相対的に示したものである。

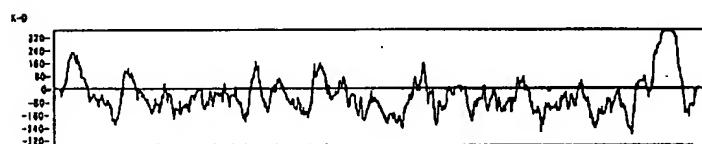
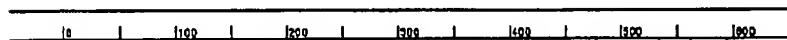
【図5】MT-MMP cDNA導入HT1080細胞中で発現したMT-MMPタンパク質を免疫沈降法により検出した結果を示したものである。図はデンシティメータによるスキャンを示したものであり、黒塗り部分が抗MT-MMPモノクローナル抗体で免疫沈降したMT-MMPの位置を示す。

【図6】MT-MMP cDNA導入HT1080細胞およびMT-MMP cDNA導入NIH3T3細胞の培養上清のザイモグラフィーにより、MT-MMPの発現による潜在型MMP-2の活性化を示したものである。

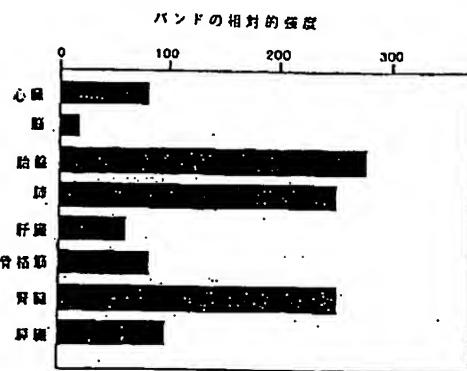
【図7】MT-MMP cDNA導入COS-1細胞の細胞膜画分による潜在型MMP-2の活性化をザイモグラフィーにより示したものである。

【図8】MT-MMPの発現による細胞の浸潤能の促進を一部改変したボイデン チャンバー (Boyden Chamber) 法により示したものである。

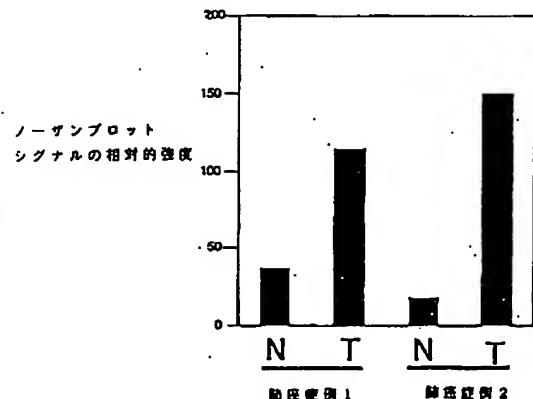
【図1】



【図3】



【図4】



【図2A】

MMP-11	MAPAAHLRSA AARALLPPMIL LLLLQPPPL. ....	LARA	33
MMP-1	MHS. ....	PPPL LLLLFWQVVVS HSFPATLETO EQDVDLVQKY	37
MMP-8	HFSLKTL. ....	PPL LLLHVOISKA FPVSSKEKNT KTVOD. ....Y	36
MMP-10	MHHL. ....	AFL VLCLPVCVA YPLSGAAKEE DSNKDLAQY	37
MMP-3	MKSL. ....	PIL LLLCVAVCVA YPLDGAARGE DTSKHLVQKY	37
MMP-9	MSLWQP. ....	LVLVLLV LCCCFAAPRQ RQSTLVLFFG DLRTNLTDRQ	43
MMP-2	.....	.....AP. .... SPIIKFPO DVAPK-TKE	19
MMP-7	MR. ....	LTVLCAV CLLPGSALP LPQEAGGMSE. ....LOWE	33
MT-MMP	MSPAP. ....	RPSR CLLLPLLTG TALASLOSAQ SSSPS-PEAH	38
Consensus	M. ....	P.L LLL. ....	50
MMP-11	LPPDVHHL. ....	HAERR-G PQPHAAALPS SP-APAPA TQEAPRPass	74
MMP-1	L-EKYYNLKN DORQVEKRRN SGPVVEKLQK MQEFFGLKVT GKPDAAETLKV	86	
MMP-8	L-EKFYQLPS NQVOSTRKNG TNVIVEKLKE MQRFFGLNVT GKPNEETLDM	85	
MMP-10	L-EKYYNLK DVKQFRRK-D SNLIVKKKIQG MQKFLGCLEVT GKLDTDTLEV	85	
MMP-3	L-ENYYDLKK DVXQFVRRKD SGPVVKKIRE MQKFLGCLEVT GKLDSDTLEV	86	
MMP-9	LAEZYLYRYG YTRVAEMROE SKSLCPALLL LQKQSLSPET GELDSATLKA	93	
MMP-2	LAVQYLNTF YGCPKE-SCM LFVVLKDTLKK MQKFFGLPQT QDLDQNTIET	67	
MMP-7	QAQDYLKRF YLVDSETK-N ANSLEAKLKE MQKFFGLPIT GNLNSRVIEI	81	
MT-MMP	L-QQCYLPP GDLRTHTQRS PQSLSAIAA MQKFYGLQVT GKADADTMKA	87	
Consensus	L-E.Y..L. ....E. ....	KL.. MQKF.GL.VT GKLD..TL..	100

【図2B】

MMP-11	LRPPRCGVPD -PSDGLSARN RQKRFVLSGC RWEKTDLTYR ILRFPWQLVQ	123
MMP-1	MKQPRCGVPD .VAQ-FVL. ....TE-GNP RWEQTHLTYR IENYTPDLP	127
MMP-8	MKQPRCGVPD .SGG-FML. ....TP-GNP KWERTHLTYR IRNYTPDLPSE	126
MMP-10	MRKPRCGVPD .VGH-FSS. ....FP-GMP KWRKTHLTYR IVNYTPDLP	126
MMP-3	MRKPRCGVPD .VGH-FRT. ....FP-GIP KWRKTHLTYR IVNYTPDLPK	127
MMP-9	MRTPRCGVPD .LGR-FOT. ....FE-ODL KMHMHNITYM IQNYSEDLP	134
MMP-2	MRKPRCGVPD .VAN-YNF. ....FP-RKP KWDKNOQITYR IIGVTPDLP	108
MMP-7	MQKPRCGVPD .VAE-YSL. ....FP-NSP KWTSKVVTYR IVSYTRDLP	122
MT-MMP	MQRPRCGVPD KFGAEIKANV RRKRYAIQGL KWHQHNEITFC IQNYTPPKVGE	137
Consensus	MRKPRCGVPD .VG..F. ....FP-G.P KW..T.LTYR I.NYTPDLP.	150
MMP-11	EQVRQTMAEA LKVVSDVTPL TFTEV. .... HEGRADL MIDPARYWOG	165
MMP-1	ADVQHAIKEA FQLWSNVTPA TFTKV. .... SEQQADI MISFVRGOHR	169
MMP-8	AEVERAIKDA FELWSVASPL IFTRX. .... SQQEADI NIAFYQRDHG	168
MMP-10	DAVDSAIKEA LKVVVEBTPL TFSRL. .... YEGEADI MISFAVKEHG	168
MMP-3	DAVDSAVEKA LKVVVEBTPL TFSRL. .... YEGEADI MISFAVREHG	169
MMP-9	AVIDDAFARA FALWSAVTPA TFTRV. .... YSRDADI VIQPGVAEHG	176
MMP-2	ETVDDAFARA FQVMSDVTPL RFSRI. .... HOGEADI MINFGRWEHG	150
MMP-7	ITVDRLVSKA LNMHGKEIPL HFRSKV. .... VVGTADI MIGFARGAHC	164
MT-MMP	YATYEAIRKA FRVYESATPL RFREVPYAYI REGHEKQADI MIFFAECFGH	187
Consensus	..VD.A..KA F.VHS.VTPL TF.RV. .... EG.ADI MI.FA..HQ	200

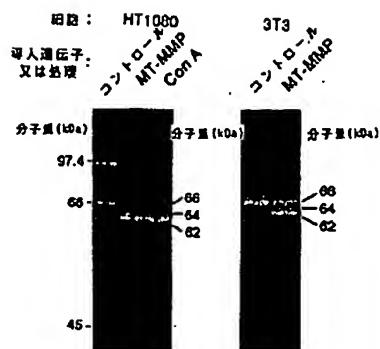
【図2C】

MMP-11	DDLPFDGPGQ ILAHAFPPKT HREGDVHFDY QETWTICDQQ CTO.....	208
MMP-1	DNSPFDCPGG NLAHAFQPGP CIGGDAHFDG HERWTNNFT EYN.....	211
MMP-8	DNSPFDCPGNG ILAHAFOPGQ OIGGDAHFDG EETWTNTSA NYN.....	210
MMP-10	DFYSPDCPGK SLAHAYPPGP OLYODIHFDD DEKWTEDAS GTN.....	210
MMP-3	DFYPPDCPGH VLAHAYAPGP OINGDAHFDG DEQWTKDTT GTN.....	211
MMP-9	DGYPPDCGKDG LLAHAPPPGP CIGQCDAXFDD DELWSLQKG VVVPTRFGNA	225
MMP-2	DGYPPDCGKDG LLAHAPAPGT GVGGDSHKFDD DELHTLQEG QVVRVVKYGN	199
MMP-7	DSYPPDCPGN TLAHAPAPGT GLGGDAHKFDE DERWTGSSL GIN.....	207
MT-MMP	DSTPPFDGEGG FLAHAYFPGR NIGGDTTHFDS AEPHTVRNE DLN.....	229
Consensus	D.YPPFDGPG .LAHAF.PGP OIGGDAHFD. DE.WT..... .N.....	250
 MMP-11	.....	208
MMP-1	.....	211
MMP-8	.....	210
MMP-10	.....	210
MMP-3	.....	211
MMP-9	DGAACHFPFI FEGRSYSACT TDGRSDQGLPW CSTTANYDTD DRFGFCPSER	275
MMP-2	DOEYCKPPFL FNGKEYNSCT DTGRSDQFLW CSTTYNFEKO QKYOFCPHEA	249
MMP-7	.....	207
MT-MMP	.....	229
Consensus	.....	300

【図2D】

MMP-11	.....	208
MMP-1	.....	211
MMP-8	.....	210
MMP-10	.....	210
MMP-3	.....	210
MMP-9	LYTROGNADG KPCQFPFIFQ QGSYSACTTD QRSDOYRWCA TTANYDRDKL	211
MMP-2	LFTMGGNAEG QPKCKPPFRFQ QTSYDSCTTE GRTDGYRHWG TTEDYDRDKK	325
MMP-7	.....	299
MT-MMP	.....	207
Consensus	.....	229
 MMP-11	.....	208
MMP-1	.....	211
MMP-8	.....	210
MMP-10	.....	210
MMP-3	.....	210
MMP-9	PGFCPTRADS TVMGGNSAGR LCVPFTFLG KEYSTCTSEG RODGRLWCAT	211
MMP-2	YGFCPETAMS TVQG-NSEGA PCVFPFTFLG NKYESCTSAQ RSDOKKWCAT	375
MMP-7	.....	348
MT-MMP	.....	207
Consensus	.....	229
		400

【図6】



【図2E】

MMP-11	.....L IQLVAA-HEFG HVLGLQHHTA AXALMSAFY-	237
MMP-1	.....L HRVAA-HELO HSLQLSHSTD IOALHYPY-	240
MMP-8	.....L FLVAA-HEFG HSLGLAHSSD PGALHYPHY-	239
MMP-10	.....L FLVAA-HELO HSLGLPHSAN TEALHYPYLN	240
MMP-3	.....L FLVAA-HEIG HSLGLPHSAN TEALHYPYLN	261
MMP-9	TSNFDSDKKW GFCPDQGQSL FLVAA-HEFG HALGLDKSSV PEALHYPHY-	423
MMP-2	TANHYDDDRKW GFCPDQGQSL FLVAA-HEFG HAMGLEHSQD PGALHAPIY-	396
MMP-7	.....FLYAATHELG HSLGMOKSSD PHAVNHYPTY-	236
MT-MMP	.....QNDI FLVAV-HELG HALGLEHSQD PSAIMAPFY-	261
Consensus	.....L FLVAA-HE.O HSLGL.HS.O P.ALHYP.Y-	450
 MMP-11	TF..-RYPPLSL SPDDCRGVQH LYG.....	258
MMP-1	TF..-SGDQQL AQDDIDGQIA IYG.....	261
MMP-8	AFRETSNSYSL PDDIDGQIA IYG.....	262
MMP-10	SFTELAQFRL SQDDVNGIQS LYG.....	263
MMP-3	SLTDLTRFRL SQDDVNGIQS LYG.....	264
MMP-9	RF..-TEGPPL HKDDVNGIRH LYGPRPEPEP RPPTTTTPQP TAPPTVCPTG	471
MMP-2	TY..-TKNFRL SQDDIKGIOE LYG.....	417
MMP-7	GNGOPQNFKL SQDDIKGIOK LYGKRSNSRK K.....	267
MT-MMP	QWMDTENFVL PDDDRRGIIQQ LYGGESGPT KMPPQPRTTG RPSVPDKPKN	311
Consensus	,F.....F..L..SQDDI.GI.Q..LYG.....	500

【図2F】

MMP-11	.....QPW PTVTSRTPAC GPQAOIDTNE IAPLEPDAPP	291
MMP-1	.....RSQNPVQD-I GPQTP.....	278
MMP-8	.....LSSNP-I QPTCP..ST P.....KPC	279
MMP-10	.....P PPASTEPL VPTKS...VP S-GSEMPAKC	289
MMP-3	.....P PPDSPETP-L VPTEP...VP P-EPGTPANC	290
MMP-9	PTVVKPSERP TAGPTOPPSA GPTGPPTA-PSTAT...TV PLSPVD-OAC	516
MMP-2	.....ASPDI-D LGTOP...TP TLGPVTPIC	440
MMP-7	.....	267
MT-MMP	PTYGPNCDCG NFDTVANLRC EMPVEKKRWF WRVRNNQVMD GYPMPIGQFW	361
Consensus	.....P..-PT.....C	550
 MMP-11	DACEASFDAV STIR-GEIFF FKAGFWRLR CGQL-QPGYP ALASRHWQQL	339
MMP-1	DS-KLTFDAL TTIR-GEVNF FKDRFYMR-T NPFY-PEVEL NFTSVFWPQL	324
MMP-8	DP-SLTFDAL TTIR-GEIILF FKDRFYMR-R HPQL-QRVEW NFISLFWPSL	325
MMP-10	DP-ALSFDAI STLR-GEYLF FKDRFYMR-R SHWN-PEPZF HLISAFWPSL	335
MMP-3	DP-ALSFDAV STLR-GEILF FKDRFYMR-K SLRK-LEPEL KLISSFWPSL	336
MMP-9	NV-NI-FDAI AEIG-NQLYL FKDGKYMRF EORSRPQGP FLIAOKWPAL	563
MMP-2	KQ-DIVFDGI AQIR-GEIFF FKDRFYMR-TV TPRD-KPMGP LLVATFWPEL	487
MMP-7	.....	267
MT-MMP	RGLPASINTA YERKDGKFWF FKODKHHVFD EASLEPGYPK HIKELGRO-L	410
Consensus	D.....FDAI ..T.R-GE..F FKDR..WR.. ..L.S.FWP.L	600

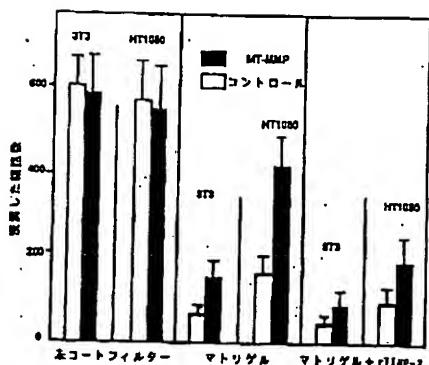
【図2G】

MMP-11	P-SPVDAAFE -DAQGHIWFF QGAQYVWVYDQ EKPVLG---P APL-TELGLV	383
MMP-1	P-NGLEAAYS PADRDEVRRF KGNKYWAVQG QNVLHG---YP KDIYSSFOFP	371
MMP-8	P-TGIQAYAE DFDRDLIFLF KGNQYWALSG YDILQG---YP KDI-3NYGFP	371
MMP-10	P-SYLDAAYE VNSRDTVFIF KGNEFWAIRO NEVQAG---YP ROI-HTLGFP	381
MMP-3	P-SGVDAAYE VTSKDLVIFIF KGNOPWAIRG NEVRAAG---YP ROI-HTLGFP	382
MMP-9	P-RKLDSVFE EPLSKKLFFF SGROVWVYTG ASV-LG---P RRL-OKLGLG	607
MMP-2	P-EKIDAVYE APQEEKAVFF AGNEYWIYSA STLERO---YP KPL-TSLGLP	533
MMP-7	.....	267
MT-MMP	PTDKDIAALF WMPNGKTYFF RGNKYYRFNE ELRAVDSEYP KNIKVWEGIP	460
Consensus	P-..DAAYE .....PF .GN.YW...G .....G---YP ..I...LG.P	650
MMP-11	R-..FPVHAAL VHGPEXNKIY FF8GRDYWRF HPSTRRVDP SP VPRRATOWRG	631
MMP-1	RTVKHIDAAL S-EENTOKTY FFVANKYHRY DEYKRSMDPQ YPKMIAHDFP	420
MMP-8	SSVQAIDAAV F---YRSKTY FFVNDQFWRY DNQRQFMMEPG YPKSISGAPP	418
MMP-10	PTIRKIDAAV S-DKEKKKTV FFAADKYMRF DENSQSMEEQG FPRLIADDPP	430
MMP-3	PTVRKIDAAI S-DKEKNTY FFVEOKYHWF DEKRNSMMPG FPKQIAEDFP	431
MMP-9	ADVAQVTGAL R-SGRKCKM-L LFSORRLWRF DVKAQMVDPK SASEVDRMFP	655
MMP-2	PDVQRVDAAF N-WSKNKKTY IFAGDKFWRY NEVKKKMDPG FPKLIAOAWN	582
MMP-7	.....	267
MT-MMP	ESPRGSFM-G SDEVFTYFYK GNKYWKFNNQ KLKVEPGYPK SALRDMGCP	509
Consensus	..V...DAA. ....KTY FF...K.WR. D....M.PG .P..I...FP	700

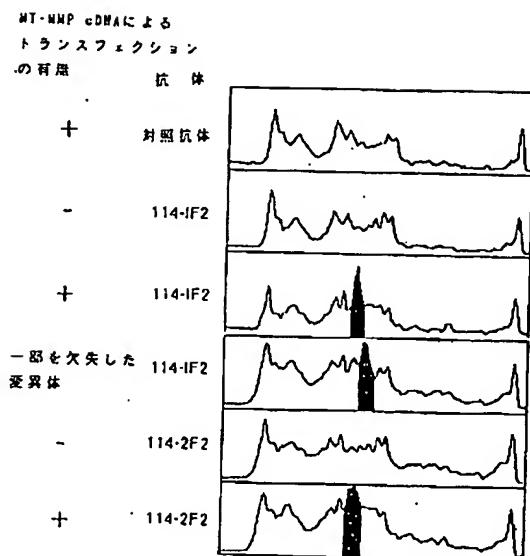
【図2H】

MMP-11	VPSE--IDAA FQDADGYAYF LRGRLYWKFD PVVKVALEGF PRLV-----	473
MMP-1	GIGH--KVDA V--FMKDGFF -----YF-FH GTRQYKFDPK TKRILTLQ--	458
MMP-8	GIES--KVDA V--FQQEHFF -----HV-FS GPRYYAEDLI AQRVTRVA--	456
MMP-10	GVEP--KVDA V--LQAFGFF -----YF-FS GSSQFEDDPN ARVTHIL--	468
MMP-3	GIDS--KIDA V--FEEFGFF -----YF-FT GSSQLEFDPN AKVVTHTL--	469
MMP-9	GVPL--DTHD VFQYREKAYF CQDR-FY WRVSSRSELN QVDQVGVY--	697
MMP-2	AIPD--NLDA VVDLQGGG- -----HS-YF FKGAYYLKLE N-QSLKSVKF	621
MMP-7	.....	267
MT-MMP	SGORPDEGTE EETEVIIIEV DEEGGGAVSA AAIVLPVILL LLVLAVGLAV	559
Consensus	G.....DA V-.....F -----F. -----	750
MMP-11	...GPD-FFG CAE-----PA NTFLX-----	489
MMP-1	...KANSVFN CR-----KN -----	469
MMP-8	...RONKVLN CRY-----GX -----	468
MMP-10	...KSNSVNLH C-----	476
MMP-3	...KSNSVNLH C-----	477
MMP-9	...TYD-ILQ CPE-----DX -----	708
MMP-2	GSIKSD-WLQ C-----	631
MMP-7	.....	267
MT-MMP	FFFRRHGTPR RLLYQCRSSL DKV-----	582
Consensus	....WL. C-----	796

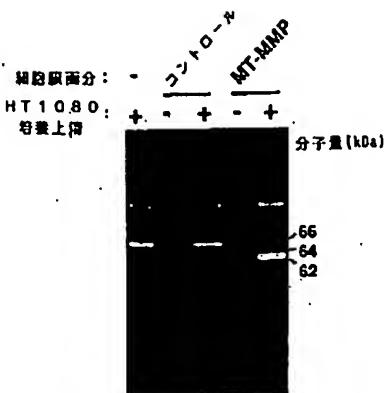
【図8】



【図5】



【図7】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl. 6 識別記号 市内整理番号 F I 技術表示箇所  
 C 1 2 N 1/21 8828-4B  
 15/09 ZNA  
 C 1 2 P 21/08 9161-4B  
 G 0 1 N 33/53 D  
 33/573 A  
 33/574 Z  
 33/577 B  
 // A 6 1 K 39/395 P  
 (C 1 2 N 9/64  
 C 1 2 R 1:19)  
 (C 1 2 N 1/21  
 C 1 2 R 1:19)  
 (C 1 2 P 21/08  
 C 1 2 R 1:91)